

Institut de Chimie physiologique de l'Université
de Fribourg (Suisse)

**Séparation et détection de l'adrénaline
et de l'artérénol dans un mélange, au moyen
de la chromatographie sur papier,
par le β -naphtaline sulfonate
du 2-chloro-4-nitro-1-diazobenzène**

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Bâle
pour l'obtention du grade de Docteur en médecine

par

Pierre Buchs, médecin
de Fribourg

FRIBOURG

Imprimerie Fragnière Frères
1953



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548223_0082

Institut de Chimie physiologique de l'Université
de Fribourg (Suisse)

**Séparation et détection de l'adrénaline
et de l'artérénol dans un mélange, au moyen
de la chromatographie sur papier,
par le β -naphthaline sulfonate
du 2-chloro-4-nitro-1-diazobenzène**

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Bâle
pour l'obtention du grade de Docteur en médecine

par

Pierre Buchs, médecin
de Fribourg

FRIBOURG

Imprimerie Fragnière Frères
1953



A ma mère

Travail exécuté sous la direction de Monsieur le professeur *Dr Werner Schuler*.

Approuvé par la Faculté de médecine de Bâle, sur la proposition des professeurs *Dr K. Bucher* (Bâle) et *Dr W. Schuler* (Fribourg).

Bâle, le 9 mars 1953.

Jour de promotion: - 9. März 1953

Il nous est un plaisir de remercier ici Monsieur le professeur Schuler qui a dirigé notre thèse, et n'a cessé, tout au long de son élaboration de nous faire bénéficier de ses précieux conseils.

Nous remercions également Monsieur le professeur Bucher, qui nous a fait l'honneur d'examiner notre travail, et de le présenter à la Faculté de médecine de Bâle.

Nous tenons enfin à exprimer notre gratitude à Monsieur P. Portmann, Dr ès sciences, pour l'intérêt qu'il a témoigné à nos recherches, et pour son amabilité.

INTRODUCTION

Il n'existe pas encore de méthode définitive satisfaisante, permettant de séparer et de doser l'adrénaline et l'artérénol dans un mélange. Or cette question, ainsi que nous l'exposons plus loin, est importante et actuelle.

Notre travail contribue à élaborer une technique de séparation des deux amines, par chromatographie sur papier, au moyen de la réaction de W. Schuler et P. Heinrich, avec le réactif β -naphtaline sulfonate du 2-chloro-4-nitro-1-diazo-benzène. (Réactif N.N.C.D.). Nos expériences, purement qualitatives, sont la première étape d'une telle méthode, et traitent de l'adrénaline et de l'artérénol, uniquement en mélange chimique.

Si nous nous sommes arrêtés à un procédé physico-chimique, c'est que la chromatographie sur papier se prête fort bien à la micro-analyse, et qu'elle élimine une source d'inexactitude des méthodes biologiques: les variations individuelles de réaction des organes-tests.

GÉNÉRALITÉS

En 1910 déjà, soit 9 ans après la découverte de l'adrénaline, Barger et Dale trouvent la relation suivante entre l'activité sympathicomimétique et la constitution chimique: «Das für eine sympathicomimetische Wirkung optimale Kohlenstoffskelett besteht aus einem Benzolring mit einer Seitenkette von zwei Kohlenstoffatomen, von denen das endständige eine Aminogruppe trägt und am Benzolring zwei phenolische Hydroxylgruppen in 3,4 Stellung zur Seitenkette sowie eine alkoholische Hydroxylgruppe in der Seitenkette hat ». Or l'artérénol répond parfaitement à ces exigences.

Cannon et Rosenblueth (1933-1937) remarquent que les substances adrénériques libérées par excitation du système nerveux sympathique présentent un antagonisme: une action purement excitative (Sympathin E), et une autre, inhibitrice (Sympathin I). A la suite de ces travaux, et de ceux de Bacq, on identifie la sympathine E à l'adrénaline, et la sympathine I à l'artérénol.

Mais quel est le mode de formation de ces amines qui toutes deux, ont une activité hormonale? Sont-elles sécrétées séparément par les cellules chromaffines de la médullaire surrénale? Ou dérivent-elles nécessairement l'une de l'autre?

Selon W. Schuler, l'adrénaline dérive de la tyrosine. Cette dernière, sous l'action de décarboxylases rénales, se transforme en tyramine. Dans une phase ultérieure, purement surrénale, la tyramine est oxydée en hydroxy-

tyramine (dihydroxy-3,4-phényl)-éthylamine, puis en (dihydroxy-3,4-phényl)-1-amino-2-éthanol-1 qui, par méthylation, donne l'adrénaline, (dihydroxy-3,4-phényl)-1-méthylamino-2-éthanol-1.

P. Holtz et coll. reprennent l'essentiel de cette théorie, tout en y apportant quelques modifications: pour eux la tyrosine se transforme en dihydroxy-phényl-alanine, puis en hydroxy-tyramine, sous l'action de ferments. De l'hydroxy-tyramine à l'adrénaline, on a le choix entre deux produits intermédiaires: l'épinine, improbable, car on n'en a jamais décelé dans l'organisme humain, et l'artérénol, ce qui paraît vraisemblable. (P. Holtz et G. Kroneberg, 1949.)

L'hypothèse de la transformation de l'artérénol en adrénaline par fixation d'un groupe méthyle, avait déjà été émise par Blaschko (1942). Par la suite, Bülbring le confirme expérimentalement dans des extraits biologiques, par une adjonction de choline, et en présence de triphosphate d'adénosine qui catalyse la réaction. *In vivo*, la choline, donateur de groupes méthyles, provient sans doute des lécithines, ou d'autres phospholipides.

Cette méthylation n'est d'ailleurs ni immédiate, ni absolue, puisque les surrénales sécrètent aussi bien de l'artérénol que de l'adrénaline (Meier et Bein), et que dans l'urosympathine, substance hypertensive de l'urine, on trouve, à côté de l'hydroxy-tyramine, de l'adrénaline et de l'artérénol. (Holtz et coll. 1947.)

Quant à l'inactivation des catécholamines, une voie semble être celle de l'oxydation. Par cyclisation de la chaîne latérale, il se forme un noyau de pyrrolidine. L'adrénaline se transforme en adrénochrome (Bacq, 1948; Derouaux), et l'artérénol en nor-adrénochrome (Harley-Mason).

Les nombreuses méthodes que nous exposons plus loin

mettent en évidence la présence d'adrénaline et d'artérénol dans l'organisme humain. Dans la médullaire surrénale, la part d'adrénaline est d'environ quatre fois plus élevée que celle de l'artérénol. Dans les autres tissus, et particulièrement dans tout le système nerveux sympathique, il y a une nette prédominance d'artérénol: la part d'adrénaline n'atteint que quelques unités pour-cent du mélange actif. On peut donc en conclure, que l'agent naturel de la transmission de l'excitation nerveuse, au niveau des terminaisons sympathiques, n'est pas l'adrénaline comme on l'admettait jusqu'ici, mais bien l'artérénol. Dans les phaeochromocytomes, on a également une surabondance d'artérénol (Holton P.). Cela semble expliquer les crises d'hypertension paroxysmales, caractéristiques de cet état pathologique. L'artérénol, en effet, par une vaso-contriction brève mais énergique, élève la résistance périphérique, et cause secondairement l'hypertension, tandis que l'adrénaline agirait principalement sur la musculature cardiaque, avec hypertension, phénomène composé par une vaso-dilatation périphérique. (H. Barcroft et H. Konzett; H.-J.-C. Swan.)

Il serait intéressant de connaître aussi le rôle joué par l'adrénaline et l'artérénol dans la réaction de « stress ». La décharge d'ACTH, avec formation de 17-hydroxycorticostérone et de corticostérone, est-elle consécutive à une hypersécrétion de la médullaire surrénale? Dans ce cas, quelle est la composante principale, et comment agit-elle?

Autant de questions dont nous ignorons encore les réponses. Considérons pour le moment l'adrénaline et l'artérénol comme un système d'antagonistes dont l'équilibre garantit des réactions physiologiques normales.

La séparation des deux hormones, on le voit, est un problème actuel, tant dans le domaine chimique, que physio-pathologique.

PREMIÈRE PARTIE

Séparation et détection de l'adrénaline et de l'artérénol dans un mélange

Dès que l'on entrevoit le rôle important joué dans notre organisme par l'artérénol, de nombreuses méthodes furent mises au point, pour détecter et doser ce produit, seul, ou en présence d'adrénaline. Nous les passerons brièvement en revue: elles sont trop récentes pour que nous puissions en faire une critique objective.

a. Méthode chimique

Tullar isole l'artérénol d'un extrait de glande surrénale, en présence d'adrénaline. Il arrive à ce résultat par plusieurs cristallisations successives des catécholamines sous forme de d- et l-bitartrates. Cette méthode, datant de 1949, permet de séparer pour la première fois à partir d'un extrait biologique, de l'artérénol lévogyre chimiquement pur.

b. Méthodes physico-chimiques

1. Spectrophotométrie

Auerbach et Angell déterminent la teneur en artérénol de différentes adrénalines en solution ou même cristallisées. Ils établissent par analyse spectrale une

courbe-étalon d'adrénalines à teneur en artérénol croissante, et, par comparaison, déduisent le pourcentage d'artérénol des solutions à étudier. Il est intéressant de constater que des adrénalines soi-disant pures, contiennent suivant ces auteurs de 10-20% d'artérénol.

D'autres méthodes (v. Euler, *Acta phys. scand* 1949), reposent sur le fait que l'adrénaline et l'artérénol sont toutes deux facilement oxydables, mais dans des proportions différentes suivent le pH ; pour un pH de 4, l'adrénaline est oxydée, par exemple, par une solution d'iode 0.1n, tandis que l'artérénol ne l'est que faiblement. Par contre lorsque le pH s'approche de la neutralité, les deux amines le sont totalement.

2. Fluorométrie

West modifie la méthode de détermination de l'adrénaline de Gaddum et Schild. La différence de fluorescence des dérivés de l'adrénaline et de l'artérénol en présence d'alcali, permet de construire des courbes-étalon. Heller et coll. partent du même principe: l'oxydation est facilitée par l'adjonction d'alcali concentré. Puis on fait réagir avec des phosphates inorganiques tantôt l'adrénaline d'abord, tantôt l'artérénol. L'intensité de la fluorescence sous lumière incidente ultra-violette varie, et indique le pourcentage de ces substances dans un mélange. C'est sur l'oxydation des catécholamines encore, après adsorption par de l'hydroxyde d'aluminium, que se basent les méthodes de v. Euler (*Arch. int. Pharmacodyn*, 1948), et de Lund.

3. Chromatographie

Nous étudierons plus loin, et en détail, les diverses méthodes de séparation de l'adrénaline et de l'artérénol

au moyen de la chromatographie sur papier. Il existe aussi un procédé de séparation chromatographique des deux substances par une colonne de permutite neutre. Lecomte et Fischer estiment les produits d'oxydation au photomètre de Pulfrich. Cette méthode toutefois ne convient que si les quantités à séparer sont supérieures à 0,2 mg.

c. Méthodes biologiques

Elles résident dans la différence d'activité des deux hormones au point de vue pharmacologique. L'étude des contractions de l'utérus, par exemple, est un test souvent employé, car cet organe très sensible à l'adrénaline, demeure presque insensible à l'artérénol. La membrane nictitante fournit également de bons résultats, puisque privée de ses nerfs, elle réagit beaucoup plus à l'artérénol que la membrane normale, particulièrement sensible, elle, à l'adrénaline.

En général on détermine d'abord l'activité du mélange sympathicomimétique, que l'on compare à celle d'une solution standard d'adrénaline; on observe encore l'effet du mélange sur un organe plus sensible à l'une des amines qu'à l'autre. Les principales méthodes utilisent leurs propriétés sympathicomimétiques suivantes:

- La contraction de l'utérus, (E. Bülbring; E. Bülbring et J. H. Burn, 1949; U. S. v. Euler, 1946; J. H. Gaddum et coll., 1949; G. B. West *J. Physiol*, 1947).
- Le ralentissement du péristaltisme intestinal, (E. Bülbring; E. Bülbring et J. H. Burn, 1949; U. S. v. Euler, 1946; J. H. Gaddum et coll., 1949; P. Holtz et H. J. Schümann).
- L'effet hypertenseur, (E. Bülbring; U. S. v. Euler,

1946; U.-S. v. Euler et U. Hamberg, *Nature* 1949; P. Holton).

- L'augmentation de la glycémie, (P. Holtz et H. J. Schümann; H.-J. Schümann, 1948).
- La contraction de la rate, (J. H. Gaddum et coll., 1949).
- La dilatation de la pupille, (U. S. v. Euler, 1946).
- Le rendement du muscle cardiaque, (E. Bülbring);
- Action sur la membrane nictitante, (E. Bülbring; J.-H. Gaddum et coll., 1949).
- Action sur l'oreille. (J. H. Gaddum et coll., 1949).

Dans ces méthodes, on a intérêt à ce que les catécholamines soient stables, ou ne s'oxydent que difficilement. Dans le sang, il semble que ce soit l'acide ascorbique qui ait cette fonction réductive protectrice (Heard et Welch). Pour les dosages biologiques, de nombreuses substances ont été proposées pour inhiber cette oxydation. Le B.A.L. entre-autre, présente un potentiel d'oxydo-réduction tel, qu'il neutralise tout oxydant ajouté à une solution contenant des sympathicomimétiques, et qu'il fixe les traces de métaux lourds, catalyseurs de ces oxydations, sans agir pour autant sur les propriétés pharmacologiques (Z.-M. Bacq, J. Lecomte et P. Fischer).

Derouaux étudia en 1943 les rapports entre l'adrénaline et l'adrénochrome, oxydant la première par une phénoloxydase extraite de lamelles de champignons. James, sur ce même principe élabore une

méthode enzymatique (1948)

Adrénochrome et nor-adrénochrome sont obtenus au moyen de polyphénolases contenues dans l'*Atropa belladonna*. Par cette même réaction colorimétrique Holton décele la présence d'adrénaline et d'artérénol dans des phaeochromocytomes.

**Méthode de P. Heinrich et W. Schuler
au moyen du réactif N.N.C.D.**

Le mérite de ces auteurs a été de trouver un réactif sensible et assez spécifique, pour les orthodihydroxy-benzènes. Ce sont là de grands avantages, si on le compare, soit aux réactifs d'oxydation (acide phosphotungstique, acide arséno-molybdique), soit aux autres sels de diazobenzène, qui réagissent avec de nombreux dérivés du phénol et de l'imidazole, par des réactions colorées de nuances très voisines.

Le N.N.C.D. (β -naphtalinesulfonate du 2-chloro-4-nitro-1-diazobenzène) réagit avec l'adrénaline et l'artérénol. Les sulfonates de naphtaline doivent être purs; ils ne contiennent ni nitrites, ni amines, qui puissent fausser les résultats. Ils sont d'autre part très stables et facilement dosables. Leur spécificité pour les o-dihydroxy-benzènes est encore accrue si l'on fait suivre une première réaction en milieu acide, d'une seconde, en milieu basique. (E. Lazarus; W. Schuler, P. Heinrich, E. Lazarus). Les dérivés de l'indole et les nono-hydroxy-benzènes donnent des réactions différentes. C'est sur cette dernière propriété que repose le principe de la méthode du dosage séparé de l'adrénaline et de l'artérénol.

Heinrich et Schuler constatent que pour un pH de 1, l'adrénaline réagit deux fois plus fortement que l'artérénol. Son coefficient d'extinction, mesuré par photométrie est donc plus élevé. Par contre si l'on ajoute à la solution contenant le mélange, un tampon d'acétate de sodium, puis après avoir laissé reposer quelque minutes, de la soude, c'est l'artérénol qui réagit deux fois mieux que l'adrénaline. En comparant les deux résultats, et

avec l'aide d'une courbe d'extinction standard, on calcule exactement la quantité des deux amines en solution dans le mélange.

Cette méthode fut employée avec succès pour déterminer la teneur en catécholamines des glandes surrénales de plusieurs animaux.

Il est prématuré de porter un jugement objectif sur ces différentes méthodes. Aucune ne s'impose à nous comme parfaite. La spécificité de la plupart d'entr'elles reste douteuse. Les résultats numériques des dosages présentent une telle discordance que nous nous abstenons de citer des chiffres définitifs. D'ailleurs adrénalinhémie et artérénoihémie varient non seulement suivant les méthodes employées, mais dans les mêmes conditions d'expérience, elles sont sujettes au long de la journée, à des modifications physiologiques, dont la nature nous échappe encore.

DEUXIÈME PARTIE

La chromatographie sur papier

La technique de la chromatographie sur papier fut mise au point par Consden, Cordon et Martin en 1944, pour l'analyse qualitative de divers acides aminés. La chromatographie habituelle ne se prêtait pas à la micro-analyse, car l'adsorbant, une colonne de gel de silice, retenait une partie des corps à séparer. Il fallut trouver un adsorbant se comportant en support inerte; or la cellulose répondit parfaitement à cette condition. On procède donc de la manière suivante:

Une gouttelette de la solution contenant les corps à séparer est déposée près de l'extrémité d'une bande de papier filtre. La goutte séchée, on place cette extrémité dans un solvant approprié, saturé d'eau. Le solvant progresse lentement, gagne la tache et entraîne les corps à séparer proportionnellement à leur coefficient de partage entre le solvant et la cellulose gorgée d'eau. L'expérience se déroule en vase clos, dans un milieu saturé par les vapeurs du solvant. Lorsque celui-ci a parcouru une distance suffisante sur la bande de papier, on l'évapore, puis on révèle la position de corps séparés au moyen d'un réactif approprié. Chaque substance est alors caractérisée par une valeur numérique constante pour un même solvant: le R_f , c'est à dire, le rapport entre la distance parcourue

par la substance considérée et la distance parcourue par le solvant.

Cette méthode connut tout de suite un grand succès. Les nombreuses modifications apportées par la suite n'en changent toutefois pas le principe. Au lieu du papier filtre Whatman N° 1, préconisé par Consden, Gordon et Martin, et généralement admis, d'autres auteurs proposent le papier Schleicher and Schüll N° 470 (C. Yanofsky et coll.) ou le N° 597 (M. Goldenberg et coll.), ou encore le papier Eimer and Amend N° 9-330 (H. Goldenberg et coll.). Enfin le coton, le coton mercerisé et la laine de verre servent également de support (J. Lenoir; W. H. Longenecker).

La chromatographie sur papier, — toujours selon la méthode initiale de Consden, Gordon et Martin — se pratique aussi à deux dimensions: le solvant parcourt une première fois le papier, on l'évapore, puis on recommence l'expérience une seconde fois avec le même ou un autre solvant, ayant tourné le papier de 90 degrés. On obtient de cette façon une séparation plus parfaite, puisque deux substances, chimiquement très semblables progressent plus ou moins vite avec l'un ou l'autre solvant. La chromatographie à une dimension est cependant la plus généralement adoptée: elle donne des résultats tout à fait satisfaisants. Là encore, suivant la progression du solvant on distingue une chromatographie:

- ascendante (M. Goldenberg et coll.; R. A. Evans et coll.; R. J. Williams et coll.; etc.).
- descendante, (H. K. Mitchell et coll.; J. W. H. Lugg et coll., etc.);
- radiaire, en appliquant substances et solvant au milieu du papier (L. Rutter);
- à « large scale »: les produits à analyser sont déposés

au moyen d'un capillaire sur le papier qui tourne entre deux kymographes superposés (Yanofsky et coll.);

- Wieland et Fischer enfin, incluent les chromatogrammes dans un circuit électrique, et séparent de cette manière des acides aminés neutres, acides et basiques.

La mise en évidence des substances séparées se fait ordinairement au moyen de réactions chimiques colorimétriques. Une lecture directe par fluorescence a été tentée avec succès pour l'adrénaline seule par Shea, avec un photomètre convenablement modifié.

Emploi de la chromatographie sur papier en biologie

A côté de la chimie des sucres et de la chimie inorganique où la chromatographie sur papier est largement employée, elle trouve en biologie un domaine aussi vaste que varié. L'énumération de toutes les possibilités qu'elle offre sort du cadre de ce travail. Qu'il nous soit cependant permis de donner un bref aperçu de quelques-unes de ses diverses applications, intéressant particulièrement le médecin.

On a identifié ainsi les acides aminés de la toxine diphtérique, (A. J. Woiwod) des chromosomes de la *Drosophila virilis*, (J. Blumel et coll.) de l'embryon de la *Rana pipiens*, (C. Li et coll.) du virus de la mosaïque du tabac; (F. J. R. Hird).

Les différentes vitamines ont été isolées, classées en sous-groupes, ou séparées de substances leur ressemblant. C'est ainsi que l'on découvrit 4 sortes de vitamine B 12, avant même de connaître leur constitution chimique:

- Vit. A (S. P. Datta et coll.).
- Vit. B (W. F. J. Cuthbertson et coll.; I. M. Hais et coll.; W. A. Winsten et coll., 1949; E. L. Smith et coll., 1949).
- Vit B6 (W. A. Winsten et coll., 1948).
- Vit. B12 (W. F. J. Cuthbertson et coll.; W. A. Winsten et coll., 1949; L. Smith, 1951).
- Vit. C (A. J. P. Martin).

La chromatographie sur papier s'emploie également pour séparer les différents corticostéroïdes de l'urine (A. Zaffaroni et coll.) ou pour dépister, dans la myelose multiple, l'albumine de Bence-Jones (C.-E. Dent et coll.).

La séparation de l'adrénaline et de l'artérénol par chromatographie sur papier¹

En 1948, W. O. James sépare pour la première fois l'adrénaline et l'artérénol dans un mélange, au moyen chromatographie sur papier, à une dimension selon la technique de Gordon, Consden et Martin. Les substances se présentent sous forme de chlorhydrates, en milieu neutre ou légèrement acide; elles sont ainsi plus stables à l'air, et la chaleur nécessaire à évaporer le solvant — le phénol — ne risque pas de les oxyder. Le choix d'un réactif présente quelques difficultés. Le bleu arséno-phosphotungstique est immédiatement réduit, au seul contact du papier; on ne peut donc l'employer. La ninhydrine réagit bien avec l'artérénol, mais trop faiblement avec l'adrénaline. Elle permet toutefois d'exclure d'autres acides aminés. Le ferricyanure de potassium, par contre, oxyde promp-

¹ Les résultats numériques de ces travaux, ainsi que les données techniques figurent plus loin, dans la partie expérimentale.

tement l'adrénaline aussi bien que l'artérénol, donnant avec la première une coloration rouge-clair, et avec la seconde une tache rouge-brun. Les taches sont fortement colorées, bien limitées, et distantes l'une de l'autre de plusieurs centimètres. Cette méthode fut appliquée avec succès pour prouver la présence d'adrénaline et d'artérénol dans des extraits biologiques.

Deux ans plus tard, James communique de nouveaux résultats, obtenus avec d'autres solvants. Les substances elles-mêmes ne sont plus sous forme de chlorhydrates, mais de trichloracétates et d'acétates. Du butanol normal, saturé avec l'acide organique correspondant, remplace le phénol comme solvant. La révélation des taches se fait également par du ferricyanure de potassium. Cette méthode est loin d'être aussi satisfaisante que la première, avec le phénol. L'acide trichloracétique donne de bonnes séparations, mais les taches sont plus étendues qu'avec l'acide acétique.

Entre ces deux publications, en 1949, v. Euler et Hamberg (*Nature* 1949) annoncent à leur tour qu'ils viennent d'obtenir, par les mêmes moyens une séparation, avec du n-butanol saturé d'acide chlorhydrique normal. Une photo montre la parfaite correspondance entre la migration d'un extrait de glande surrénale purifié par de l'alumine, et un mélange d'adrénaline et d'artérénol. Cette photo, malheureusement ne donne qu'un fragment des chromatogrammes, de telle sorte qu'il n'est pas possible de le situer. Les valeurs trouvées et le temps de migration ne figurent pas dans le travail.

Un mois plus tard, toujours en 1949, paraît une communication de Goldenberg, Faber, Alston et Chargaff, consacrée au même sujet. Les catécholamines sont dissoutes dans de l'alcool acidifié. Au phénol, saturé d'eau,

ces auteurs ajoutent une petite quantité de 8-hydroxy-quinoline, qui, par une réaction encore ignorée, rend les taches plus petites, les concentre en les ramassant. Le développement se fait avec le ferricyanure de potassium. La séparation des deux amines est très bonne.

Glazko enfin, emploie cette même méthode. Il reproche cependant au ferricyanure d'être trop peu sensible aux basses concentrations. Il le remplace par une solution de β -naphtoquinone-4-sulfonate de sodium dissoute dans un tampon de borate, de telle sorte que le réactif ait un pH de 8,6. On obtient une coloration bleue en présence d'adrénaline et rouge en présence d'artérénol.

* * *

Le problème de la séparation de l'adrénaline et de l'artérénol est donc bien actuel. Nous nous efforçons, dans notre partie expérimentale, de reproduire les résultats de ces travaux. Puis, nous nous pencherons spécialement sur la question de la révélation des amines par le réactif N.N.C.D., et nous discuterons de l'opportunité de cette dernière méthode.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions de travail

Dans l'ensemble de nos expériences, nous adoptons la chromatographie à une dimension, sur des bandes de papier filtre Whatman N° 1. Au début nous avons employé des bandes de 3×40 cm, puis nous en sommes venus à des bandes plus larges, de $7,5 \times 40$ cm, sur lesquelles 3 ou 4 expériences peuvent se dérouler en parallèle. De cette manière on a l'adrénaline, l'artérénol, et un ou deux mélanges des deux, exactement dans les mêmes conditions. Après quelques essais en chromatographie descendante, nous préférons la méthode ascendante, et c'est cette dernière que nous avons utilisée pour nos recherches. Elle nécessite un temps légèrement plus long, mais le parcours du liquide est plus régulier; on évite aussi une source d'impuretés: le support sur lequel chevauche la bande de papier qui trempe d'un côté dans le solvant. Les R_f sont d'ailleurs identiques dans les deux cas.

Les substances à séparer — en solution — sont déposés à 3 cm de l'extrémité d'une bande de papier filtre; un léger repère au crayon en indique préalablement l'endroit, et permettra plus tard de calculer les R_f . Nous appliquons les substances au moyen de pipettes de 0,1 cc graduées au millième, ou de tubes capillaires étalonnés. Nous désirons détecter de 5-50 γ de substance; pour cela,

et avec nos dilutions habituelles, nous déposons de 0,02 à 0,005 cc de solution, non en une fois, ce qui ferait une tache initiale beaucoup trop étendue, mais en de nombreux attouchements, ne laissant écouler sur le papier qu'une quantité minime de liquide, qu'on laisse évaporer, et recommençant l'opération aussi souvent qu'il le faut pour atteindre la quantité prévue. Cette évaporation est favorablement activée en dissolvant les substances dans un alcool — méthanol ou éthanol — acidifié. Nous nous efforçons de réduire le plus possible le diamètre de la tache initiale qui ne doit pas dépasser 2-3 mm. Trop étendue elle a le grand désavantage de donner des résultats très peu précis: ce ne sont plus des taches arrondies, mais plutôt de longues bandes colorées, aux limites peu claires, et dont on ne peut objectivement déterminer le centre.

Les bandes sont ensuite suspendues par leur autre extrémité à une hauteur de 39 cm, de telle sorte que leur extrémité inférieure seule trempe dans le solvant, mais non l'endroit où sont déposées les substances. Le solvant se trouve dans de petits béciers ou dans des boîtes de Pétri, dont le diamètre dépasse de 2 cm au moins, la largeur des bandes pour que le papier-filtre ne puisse entrer en contact avec les parois du récipient: ce qui causerait, par des phénomènes de capillarité, une progression irrégulière du liquide.

L'expérience se poursuit alors d'elle-même, sous cloche, dans une atmosphère saturée par les vapeurs du solvant. Ce dernier, pendant une vingtaine d'heures parcourt 20 à 35 cm. Cette distance dépend de la nature du solvant employé; pour un temps égal, elle est plus longue avec le phénol, plus courte avec le butanol, et varie encore selon la teneur en eau du butanol.

Les bandes sont ensuite retirées — on indique le

niveau du solvant par un repère — et séchées à l'étuve à 95°, dans le temps minimum nécessaire à l'évaporation complète. Puis on applique le réactif spécifique par vaporisation, et les taches résultantes sont immédiatement entourées d'un cercle au crayon. Il est ainsi plus facile d'en mesurer le centre pour les calculs. Nous avons vu que chaque substance est caractérisée par son *Rf*: la première distance, celle parcourue par le corps envisagé, est calculée à partir du repère initial jusqu'au centre de la tache résultat; la seconde, le parcours du solvant, se mesure également du repère initial, jusqu'au repère de fin de parcours. Cette manière de calculer les *Rf* convient parfaitement lorsque les taches sont petites, bien définies et bien colorées. Parfois leur limite proximale est bien plus précise que la limite distale, où la couleur tend à s'estomper; la détermination du centre de ces taches prête alors à une grande subjectivité: faut-il inscrire les limites, plus ou moins exactes, ou tenir compte de l'intensité de coloration?

Pour toutes les expériences qui vont suivre, nous faisons simultanément plusieurs essais: deux avec l'adrénaline seule, deux avec l'artérénol seul, et deux ou plus avec le mélange à parties égales des deux amines. Nous révélons une série par le réactif N.N.C.D., et l'autre — qui sert de contrôle —, au moyen du ferricyanure de potassium.

Application du réactif N.N.C.D.

Le réactif se prépare peu avant son emploi. On dissout 15 mgr. de β -naphthalinesulfonate du 2-chloro-4-nitro-1-diazobenzène dans 10 cc d'acide chlorhydrique 0,1 n. Cette solution n'est stable que quelques heures, à l'abri

de la lumière, et à une température voisine de 0°. Nous l'appliquons par vaporisation sur les chromatogrammes préalablement séchés, et vaporisons ensuite une solution de soude 1 n., pour activer la réaction. Il est parfois nécessaire encore, avec un solvant saturé d'un acide fort, d'exposer les bandes de papier quelques instants à des vapeurs d'ammoniaque. Les amines se détachent alors parfaitement sur la blancheur du papier: l'adrénaline donne une tache bleue, et l'artérénol bleu-violette.

Séparation chromatographique de l'adrénaline et de l'artérénol par le butanol

a. Butanol saturé par un acide inorganique (HCl)

10 γ de chlorhydrate d'adrénaline et 10 γ de chlorhydrate d'artérénol sont déposés sur des bandes de papier filtre, soit seuls, soit en mélange contenant 10 γ de chaque amine. Le butanol normal, fraîchement distillé est saturé d'acide chlorhydrique 0,1 n. L'expérience se déroule en vase clos, en présence de vapeurs acides (HCl). En 42 heures, le solvant parcourt environ 21 cm. Nous séchons les chromatogrammes à l'étuve, quelques minutes à 95 degrés. Puis nous les révélons, les uns au réactif N.N.C.D., de Heinrich-Schuler, les autres au ferricyanure de potassium à 0,44 % de pH 7,8, réalisant dans ce dernier cas les conditions d'expérience de v. Euler et Hamberg (*Nature* 1949). La migration des produits est très faible. On ne peut obtenir une séparation des deux substances, car elles ne parcourent guère plus de 2,5-3 cm, l'adrénaline un peu plus, l'artérénol un peu moins. Nous appliquant à reproduire les résultats photographiques de v. Euler et Hamberg,

nous varions la quantité des substances déposées, le temps d'expérience, la méthode de séchage¹.

La migration s'améliore légèrement lorsque la durée d'expérience dépasse 48 heures, mais en aucun cas, nous n'avons obtenu de séparation. Tout au plus, la couleur des taches permet de deviner que la partie proximale bleu-violette contient principalement de l'artérénol, tandis qu'à l'extrémité distale, d'un bleu plus clair, il y a prédominance d'adrénaline. La migration des produits isolés ne montre pas de différence appréciable.

Cet échec a fait l'objet d'une communication aux journées de Physiologie et de Pharmacologie de Fribourg, en 1949 (W. Schuler, P. Heinrich, P. Buchs). Un an plus tard James devait confirmer notre résultat.

Le butanol saturé d'acide chlorhydrique ne se prête pas à la séparation chromatographique de l'adrénaline et de l'artérénol.

b. Butanol saturé par un acide organique

Nous remplaçons l'acide chlorhydrique par une acide organique pour saturer le butanol, et dissoudre les amines. Là encore, nous conduisons deux séries d'expérience en parallèle: révélant l'une avec le réactif N.N.C.D., et l'autre avec du ferricyanure de potassium à 0,44%, dans un tampon de phosphate de sodium de *pH* 8,3 (James 1950).

1. Acide acétique

Les solutions à analyser contiennent 10 mgr d'adrénaline, d'artérénol, ou 20 mgr du mélange des deux à 50%, dans 0,1 cc d'acide acétique glacial, et 2 cc de

¹ Aucune de ces données ne figure dans le travail original.

méthanol. Le solvant se compose de 60 cc de butanol normal, 15 cc d'acide acétique glacial et 75 cc d'eau. Nous effectuons nos séparations avec 10 γ de substances, que nous déposons par attouchements successifs. Le solvant progresse pendant 22 heures. Dans ces conditions (James 1950), que l'on révèle les résultats au moyen du réactif N.N.C.D., ou par le ferricyanure, on obtient des taches bien limitées, très proches l'une de l'autre, reliées parfois par une traînée colorée. Nous trouvons:

Rf de l'adrénaline 0,31

Rf de l'artérénol 0,23-0,24 ¹.

La séparation est donc meilleure qu'avec le butanol saturé d'acide chlorhydrique. Les substances migrent à une vitesse différente. La tache proximale, bleu-violette avec N.N.C.D., rouge-brun avec le ferricyanure, touche la tache distale — bleu-claire ou rose-saumon —, mais la limite entre les deux est absolument nette.

2. Acide trichloracétique

Nous appliquons les amines sous forme de trichloracétates: 10 mgr d'adrénaline, d'artérénol ou du mélange, 500 mgr d'acide trichloracétique Ph.H.V., et du méthanol ad 10 cc.

Le solvant se compose de 5 gr d'acide trichloracétique, dans 100 cc d'eau, auquel on ajoute 80 cc de butanol normal, fraîchement distillé. On agite énergiquement pour que la saturation soit complète, puis on élimine le surplus d'acide. Après une vingtaine d'heures on obtient les résultats suivants ²:

¹ Dans les mêmes conditions James (1950) trouve Rf de l'adrénaline 0,31, de l'artérénol 0,25.

² Les valeurs de James (1950) sont 0,33 pour l'artérénol et 0,45 pour l'adrénaline.

Rf de l'adrénaline 0,47

Rf de l'artérénol 0,35.

Avec ce solvant les amines sont entraînées beaucoup plus loin. Tout au long du parcours la différence de migration des deux produits s'accroît; la séparation est bien plus nette qu'avec l'acide acétique. Malheureusement les taches perdent en concision et ont tendance à s'étendre en bandes étroites. Là encore, nous avons avec le réactif N.N.C.D., une belle différence de couleurs entre l'adrénaline et l'artérénol.

3. *Acide formique*

Wiggins et coll., dans une communication de 1952, relatent de bons résultats dans la séparation de sucres et d'acides aminés, en employant un mélange de butanol et d'acide formique. A notre tour, nous avons expérimenté ce solvant pour nos recherches, avec succès.

Nous dissolvons 2 mgr d'adrénaline ou d'artérénol à l'état de bases libres, dans 2 cc d'un éthanol acidifié par 1 % d'acide formique à 90 %. Nous déposons en général 0,02 cc de solution contenant à l'état de formiate 20 γ de la base, ou un mélange de 20 γ de chaque amine.

La composition du solvant présente quelques difficultés. Une petite différence dans la teneur en eau ou en acide formique du butanol, influence sensiblement les *Rf*. La température, elle-même joue un grand rôle. Une solution stable et homogène à 20° peut, en se refroidissant redonner naissance à des gouttelettes d'eau qui la troublent et modifient les *Rf*. Nous sommes partis d'une solution de 60 cc de butanol normal, 10 cc d'eau et 10 cc d'acide formique à 90 %, puis nous avons progressivement élevé le pourcentage des deux derniers produits. Mais les solvants,

peu stables, changeaient, déposant de l'eau, et faisant varier les *Rf*. Toutefois, entre le *Rf* de l'adrénaline et celui l'artérénol la différence était toujours de 0,08-0,1. Par exemple, pour une solution de 60 cc de butanol, 29 cc d'eau et 28,5 cc d'acide formique à 85 %, nous obtenions pour l'adrénaline un *Rf* de 0,24, et pour l'artérénol un *Rf* de 0,15.

Après de nombreux essais, nous adoptons la méthode suivante: le solvant se compose de 60 cc de butanol normal, 35 cc d'acide formique à 85 % et 26,5 cc d'eau. Nous portons ce mélange à ébullition pendant 1 heure, puis nous le laissons refroidir une nuit dans un décanteur. Des deux couches bien séparées, on utilise la supérieure comme solvant. Cette solution, elle aussi, peut se troubler suivant la température; nous disposons donc nos vases à chromatographie dans un thermostat, à une température de 21°. En 22-23 heures, le solvant parcourt un peu plus de 30 cm. Pour révéler les amines il est nécessaire, entre l'application du réactif N.N.C.D., et de la soude, d'exposer les bandes à des vapeurs d'ammoniaque, pour neutraliser l'excès d'acide.

Pour 20 γ de substance, les taches sont très nettes, et bien séparées. Les valeurs de nos *Rf* oscillent entre:

Rf de l'adrénaline 0,28-0,30

Rf de l'artérénol 0,17-0,18.

Pour 40 γ les *Rf* sont les mêmes, avec des taches cependant plus étendues.

Nous avons essayé d'autres solvants alcooliques: méthanol, propanol, pentanol, cyclo-hexanol. La séparation des amines dépend de la constitution de ces alcools et de leur teneur en eau. Avec certains d'entr'eux, l'eau est miscible dans n'importe quelle proportion. Et en met-on

trop peu, les produits ne migrent pas, et restent là, où on les a déposés; au contraire, y a-t-il trop d'eau, les substances seront emportées à l'autre extrémité du chromatogramme. D'après les essais que nous avons effectués jusqu'ici, ces alcools ne présentent pas d'avantages sur le butanol.

* * *

Des solvants précédents, nous retenons particulièrement le butanol-acide formique. Il nous donne de bons chromatogrammes pour la séparation de l'adrénaline et l'artérénol.

De ces expériences nous concluons d'autre part que le réactif N.N.C.D., convient parfaitement à la révélation des chromatogrammes séparés par le butanol. La spécificité du réactif, et sa différence de coloration en présence d'adrénaline et d'artérénol, lui confèrent une valeur certaine.

Séparation chromatographique

de l'adrénaline et de l'artérénol, par le phénol

Le phénol est un solvant qui convient fort bien à la séparation des deux amines. Malheureusement il réagit avec le réactif N.N.C.D., par une intense coloration bordeaux. Il n'est pas possible de distinguer sur ce fond les taches bleues et violettes de nos substances. Nous avons néanmoins continué à faire parallèlement deux séries d'expériences: révélant l'une par le réactif N.N.C.D., après élimination du phénol, l'autre par le ferricyanure de potassium, selon les données de James (1948).

Nous appliquons l'adrénaline et l'artérénol sous forme de chlorhydrates, — les bitartrates ne conviennent pas

à cette analyse —, et dans des quantités allant de 5-25 γ . Nous n'avons pas jugé nécessaire d'employer la méthode de purification du phénol de Draper et Pollard; deux distillations avant une série d'analyses ont suffi à éliminer les impuretés qui auraient pu troubler nos recherches. L'expérience se déroule en vase clos, en une atmosphère saturée de vapeurs de phénol et d'acide chlorhydrique. En 20 heures, le solvant progresse d'une vingtaine de cm. Les taches révélées par le ferricyanure sont bien limitées, parfaitement séparées, et distantes l'une de l'autre de plusieurs centimètres. Dans ces conditions, James (1948) trouve pour l'artérénol un *R_f* de 0,216. Sans aller jusqu'à une troisième décimale, toutes nos expériences avec le phénol sauf une — soit une trentaine — aboutissent à ce résultat absolument constant:

R_f de l'artérénol 0,21.

Pour l'adrénaline par contre nos valeurs sont plus élevées que celles de James (0,441):

R_f de l'adrénaline 0,47-0,49.

Goldenberg et coll. obtiennent aussi une bonne séparation des amines par le phénol, en chromatographie ascendante, et en développant les chromatogrammes au ferricyanure de potassium (0,44%). Ils ajoutent au phénol des traces de 8-hydroxyquinoline, sans en indiquer exactement la quantité; ce produit concentre et ramasse les taches.

En effet, avec 14 mgr % de 8-hydroxyquinoline, nous avons des taches très petites, nettes, et fortement colorées, d'une longueur d'un cm. environ. Sans hydroxyquinoline, et également pour 10 γ d'amines à séparer, les taches présentent, soit un halo, soit une queue dont l'intensité de coloration décroît, de telle sorte qu'il est

difficile d'en mesurer objectivement le centre ; ces bandes colorées varient entre 2 et 3 cm de longueur. Des quantités d'hydroxyquinoline allant de 7-20 mgr % ne semblent avoir aucune influence sur les *Rf*, si ce n'est qu'en l'absence de ce produit, le centre des taches devient assez subjectif.

Dans sa communication, Goldenberg propose 3 sortes de papier à chromatographie, mais n'indique pas duquel il s'est servi pour ses recherches. Peut-être faut-il voir là une des raisons pour lesquelles nos résultats ne coïncident pas entièrement avec les siens. D'autre part, il donne pour chaque *Rf* une marge de 5 centièmes, ce qui nous paraît excessif, pour un papier donné¹.

Nos résultats se placent pour l'adrénaline, entre ceux de James et ceux de Goldenberg, et cela d'une manière constante tout au long de nos essais. Nous pensons qu'une légère différence dans la composition du produit de base — l'adrénaline —, puisse expliquer cet écart.

Mais ces résultats, ne l'oublions pas, sont obtenus avec le ferricyanure de potassium. Pour qu'il soit possible d'employer le réactif N.N.C.D., nous avons tenté d'éliminer le phénol après la séparation. Des premiers essais d'évaporation dans le vide poussé, et à haute température — sans carboniser le papier — n'ont pas suffi. Il restait toujours une trop grande quantité de phénol réagissant avec le réactif. Nous obtenons de meilleurs résultats par extractions répétées à l'éther de pétrole, des bandes séchées à 100%. S'il n'est guère possible d'éliminer totalement le phénol, on peut du moins en faire disparaître

¹ Selon Goldenberg, M., Faber, M., Alston, E. J., Chargraff, E. C., *Rf* de l'adrénaline 0,50-0,55 ; de l'artéréol 0,27-0,33.

une quantité telle que, sur le fond rose pâle du papier, l'adrénaline et l'artérénol, — bleue et violette — se détachent avec suffisamment de netteté. Nos contrôles avec le ferricyanure montrent que les valeurs Rf de l'adrénaline (0,47-0,49) et de l'artérénol (0,21) sont bien constantes, et se retrouvent dans toutes les séparations au phénol.

La détection des deux amines séparées par ce solvant est bonne. Les taches sont petites et précises, sans se toucher, et sans traînées bleuâtres entr'elles.

Au cours de ces expériences nous avons fait la constatation suivante: au bout de quelques jours, tant l'adrénaline que l'artérénol, conservée à basse température, en solution HCl-alcool, donne une seconde tache, d'un Rf supérieur à la normale. Le même phénomène se produit avec un mélange des deux amines, de telle sorte que nous obtenons deux paires de taches. Ces dernières, inexistantes pour une solution de 2-3 jours, deviennent de plus en plus précises, à mesure qu'augmente l'âge de la solution, et même au bout de 10-15 jours les nouvelles taches sont aussi nettes que les habituelles.

Entre temps, Shepherd et West constatent également l'existence d'une seconde tache pour une solution de trichloracétate d'adrénaline. Nous ne pensons pas qu'il s'agisse là — suivant l'hypothèse de ces auteurs — d'une simple action de l'acide trichloracétique, puisque nous obtenons les mêmes taches avec l'acide chlorhydrique. Ne faut-il pas plutôt envisager la formation d'autres substances, qui seraient la première étape de la transformation de l'adrénaline et de l'artérénol, éventuellement par cyclisation de la chaîne latérale? (Pure hypothèse!) D'autre part nous ne révélons ces taches qu'avec le ferri-

cyanure de potassium. Elles ne réagissent pas avec le réactif N.N.C.D., ce qui prouve encore en faveur de ce dernier.

* * *

Nous avons du exclure d'autres solvants qui donnaient également avec le réactif N.N.C.D., des réactions colorées: la 2,6 lutidine, la γ -picoline et la collidine.

CONCLUSIONS

1^o Le phénol et le butanol-acide formique sont les solvants qui conviennent le mieux à la séparation chromatographique de l'adrénaline et de l'artérénol.

2^o La méthode de révélation que nous avons adoptée, le réactif N.N.C.D. de P. Heinrich et W. Schuler, est employée avec succès pour les chromatogrammes séparés par le butanol. Cette méthode n'est applicable pour le phénol que lorsque le solvant peut être éliminé après la séparation.

3^o Le butanol-HCl, employé par v. Euler et coll., ne convient nullement à une séparation chromatographique: fait que nous fûmes les premiers à démontrer (1949) et que James, un an plus tard, confirma.

TABELLES NUMÉRIQUES

Dans ces tabelles nous donnons, à titre documentaire, quelques valeurs, pour que l'on puisse se rendre compte de la moyenne des résultats. Nous prenons arbitrairement les 5 ou 10 dernières expériences avec chaque solvant adopté. Il serait fastidieux de transcrire la totalité des résultats, de même que les *Rf* d'approche, lorsque nous avons fait varier le pourcentage des composantes d'un solvant, afin d'obtenir le produit le plus approprié. Pour les autres données, nous prions le lecteur de se référer à la partie expérimentale de ce travail.

Détail de quelques chromalogrammes effectués au butanol

Expérience N°	Solvant	Rf-Artérénol	Rf-Adrénaline
1	Butanol-Acide-acétique » » » »	0,24	0,31
2		0,24	0,31
3		0,23	0,31
4		0,23	0,30
5		0,24	0,32
11	Butanol-Acide-trichloracétique » » » »	0,35	0,47
12		0,34	0,47
13		0,35	0,48
14		0,35	0,47
15		0,35	0,48

Chromatogrammes séparés par le butanol-acide formique

Expérience N°	Rf-Artéréinol	Rf-Adrénaline
21	0,17	0,28
22	0,17	0,29
23	0,18	0,29
24	0,17	0,28
25	0,18	0,28
26	0,18	0,29
27	0,18	0,29
28	0,18	0,29
29	0,17	0,30
30	0,18	0,30

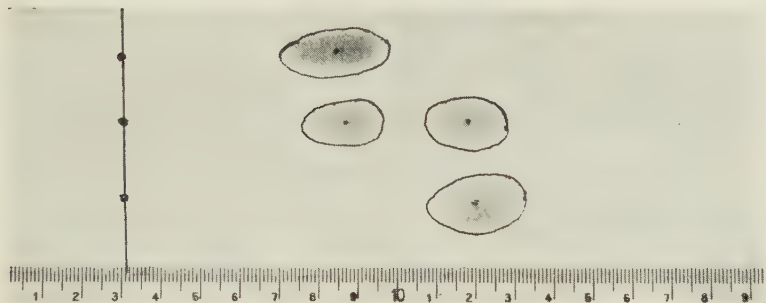
Chromatogrammes séparés par le phénol

Expérience N°	Rf-Artéréinol	Rf-Adrénaline
31	0,21	0,48
32	0,21	,048
33	0,21	0,47
34	0,21	0,47
35	0,21	0,47
36	0,21	0,47
37	0,21	0,48
38	0,22	0,49
39	0,21	0,48
40	0,21	0,49

Tableau récapitulatif des Rf

Solvant	Artéréinol	Adrénaline
Butanol-ac. acétique . . .	0,23-0,24	0,30-0,32
Butanol-ac. trichloracétique	0,34-0,35	0,47-0,48
Butanol-ac. formique. . .	0,17-0,18	0,28-0,30
Phénol	0,21	0,47-0,49

Photo d'un chromatogramme



A l'origine, on a déposé 20 γ d'artérénol (partie supérieure), 20 γ d'adrénaline (partie inférieure) et 20 γ de chaque amine (milieu).

En 22 heures, le solvant (butanol-acide formique, voir p. 30) à parcouru 31,1 cm.

Révélation par le réactif N.N.C.D.:

Rf de l'artérénol 0,17-0,18

Rf de l'adrénaline 0,28.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allen, W. J.; Barcroft, H.; Edholm, O. G., *J. Physiol.* **105**, 225 (1947).
2. Auerbach, M. E.; Angell, E., *Science* **109**, 537 (1949).
3. Bacq, Z. M., *Bull. Acad. suisse Sc. Med.* **4**, 127 (1948).
4. Bacq, Z. M.; Fischer, P., *Arch. int. Physiol.* **55**, 73 (1947).
5. Bacq, Z. M.; Lecomte, J.; Fischer P., *C. R. Soc. Biol.* **142**, 1068 (1948).
6. Barcroft, H.; Konzett, H., *J. Physiol.* **110**, 194 (1949).
7. Barger, G.; Dale, H. H., *J. Physiol.* **41**, 19 (1910).
8. Blaschko, H., *J. Physiol.* **96**, 13P (1939).
9. Blaschko, H., *J. Physiol.* **101**, 337 (1942).
10. Blumel, J.; Kirby, H., *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.* **34**, 561 (1948).
11. Bülbring, E.; *Brit. Journ. of Pharmacol. and Chemot* **4**, N° 3, 234 (1949).
12. Bülbring, E.; Burn, J. H., *J. Physiol.* **107**, 222 (1948).
13. Bülbring, E.; Burn, J. H., *Brit. Journ. of Pharmacol. and Chemot.* **4**, N° 3, 245 (1949).
14. Cannon, W. B.; Uridil, J. E., *Amer. J. Physiol.* **58**, 353 (1921).
15. Cannon, W. B.; Rosenblueth, A., *Autonomic Neuro-Effector System*, Mac Millan, New York 1937.
16. Connsden, R.; Gordon, A. H.; Martin, A. J. P., *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).
17. Cuthbertson, W. F.; Smith, L. E., *Biochem. J. Proc.* **44**, N° 2, V (1949).
18. Datta, S. P.; Overell B. J., *Biochem. J. Proc.* **44**, N° 4, XLIII (1949).
19. Dent, C. E.; Rose, G. A., *Biochem. J.* **44**, 610 (1949).
20. Derouaux, P., *Arch. int. Pharmacodyn* **69**, 205 (1943).
21. Draper, O. J.; Pollard, A. L., *Science* **109**, 448 (1949).
22. v. Euler, U. S., *Acta phys. scand.* **12**, 73 (1946).
23. v. Euler, U. S., *Acta phys. scand.* **16**, 63 (1948).
24. v. Euler, U. S., *Arch. int. Pharmacodyn.* **77**, 477 (1948).

25. v. Euler, U. S., *Nature* **162**, 570 (1948).
26. v. Euler, U. S., *Zeitschrift für Vitamin, Hormon und Fermentforschg.* Bd. II **5-6**, 596 (1948).
27. v. Euler, U. S., *Schweiz. med. Wschr.* **32**, 777 (1948).
28. v. Euler, U. S.; Hamberg, U., *Nature* **163**, 642 (1949).
29. v. Euler, U. S.; Hamberg, U., *Acta phys. scand.* **19**, 74 (1949).
30. v. Euler, U. S.; Hamberg, U., Purkhold, A., *Experientia* **V**, **11**, 451 (1949).
31. Evans, R. A.; Parr, W. H.; Evans, W. C., *Nature* **164**, 674 (1949).
32. Ferrazzini, F., *Praxis* **47**, 964 (1951).
33. Ferrazzini, F., *Praxis* **48**, 990 (1951).
34. Gaddum, J. H.; Schild, H. J., *J. Physiol.* **80**, 9 P (1934).
35. Gaddum, J. H.; Peart, W. S.; Vogt, M., *J. Physiol* **103**, 467 (1949).
36. Glazko, A. J.; Dill, W. A., *Nature* **163**, 32 (1951).
37. Goldenberg, M.; Faber, M.; Alston, E. J.; Chargaff, E. C., *Science* **109**, 534 (1949).
38. Gordon, A. H.; Martin A. J. P.; Synge, E., *Biochem. J.* **38**, 65 (1944).
39. Hais, I. M.; Pecàková, L., *Nature* **163**, 768 (1949).
40. Harley-Mason, J., *Experientia* **4**, 307 (1948).
41. Heard, Welch, *Biochem. J.* **29**, 989 (1935).
42. Heinrich, P.; Schuler, W., *Helv. Chim. Acta* **30,3**, 886 (1947).
43. Heinrich, P.; Schuler, W., *Helv. Chim. Acta* **31,2**, 320 (1948).
44. Heller, J. H.; Seltow, R. B.; Mylon, E., *Science* **112**, 88 (1950).
45. Hird, F. J. R., *Australian J. Sc.* **11**, 170 (1949).
46. Holton, P., *Nature* **163**, 216 (1949).
47. Holtz, P. Credner, K.; Kroneberg, G., *Arch. exp. Path. u. Pharm.* **204**, 229 (1947).
48. Holtz, P.; Kroneberg, G., *Kl. Wochenschr.* **37-38**, 605 (1948).
49. Holtz, P.; Kroneberg, G., *Naunyn-Schmiedebergs Arch.* **206**, 150 (1949).
50. Holtz, P.; Schümann, H. J., *Arch. exp. Path. u. Pharm.* **206**, 49 (1949).
51. James, W. O., *Nature* **161**, 851 (1948).
52. James, W. O.; Kilbey, N., *Nature* **166**, 67 (1950).
53. Lazarus, E., *Diss*, Fribourg, 1950.
54. Lecomte, J.; Fischer, P., *C. R. Soc. Biol.* **17-18**, 1294 (1949).

55. Lenoir, J., *Bull. soc. chim.* **475**, (1942).
56. Li, C.; Roberts, E., *Science* **110**, 425 (1949).
57. Longenecker, W. H., *Anal. chem.* **21**, 1042 (1949).
58. Lugg, J. W. H.; Overell, B. T., *Nature* **160**, 4055 (1947).
59. Lund, A., *Acta pharmacol.* **6**, 137 (1950).
60. Martin, A. J. P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **49**, 249 (1948).
61. Meier, M.; Bein, H. J., *Experientia* **4**, 358 (1948).
62. Mitchell, H. K.; Gordon, M.; Haskins, A., *J. Biol. Chem.* **180**, 1071 (1949).
63. Rutter, L., *Nature* **101**, 435 (1948).
64. Schuler, W.; Heinrich, P.; Lazarus, E., *Helv. physiol. Acta* **7**, C 22 (1949).
65. Schuler, W.; Heinrich, P.; Buchs, P., *Helv. physiol. Acta* **7**, C 38 (1949).
66. Schümann, H. J., *Kl. Wochenschr.* **26**, 604 (1948).
67. Schümann, H. J., *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.* **206**, 194 (1949).
68. Shea, S. M., *Nature* **165**, 729 (1950).
69. Shepherd, D. M.; West, G. B. *Nature* **169**, 797 (1952).
70. Smith, E. L.; Cuthbertson, W. F. J., *Biochem. J. Proc.* **45**, 2 XII (1949).
71. Smith, L., *Brit. Med. J.* **4699**, 151 (1951).
72. Swan, H. J. C., *Lancet* **2**, 508 (1949).
73. Tullar, B. F., *Science* **109**, 536 (1949).
74. West, G. B., *J. Physiol.* **106**, 418 (1947).
75. West, G. B., *Brit. J. Pharmacol.* **2**, 121 (1947).
76. Wieland, T.; Fischer, E., *Naturwissenschaften* **35**, 29 (1948).
77. Wiggins, L. F.; Howarth-Williams, J., *Nature* **170**, 4320 (1952).
78. Williams, R. J.; Kirby, H. M., *Science* **107**, 481 (1948).
79. Winsten, W. A.; Eigen, E., *Proc. soc. Exptl. Biol. Med.* **67**, 513 (1948).
80. Winsten, W. A.; Eigen, E., *J. Biol. Chem.* **181**, 109 (1949).
81. Woiwod, A. J., *Nature* **163**, 218 (1949).
82. Yanofsky, C. Wassermann, E.; Bonner, D., *Science* **111**, 61 (1950).
83. Zaffaroni, A.; Burton, R. B.; Kentmann, E. H., *Science* **111**, 6 (1950).
84. Zaffaroni, A.; Burton, R. B.; Kentmann, E. H., *J. Biol. Chem.* **177**, 109 (1949).

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	7
Généralités	8
Première partie:	
Méthodes de séparation et de détection de l'adrénaline et de l'artérénol dans un mélange.	11
Méthode de Heinrich-Schuler au moyen du réactif N.N.C.D.	15
Deuxième partie:	
La chromatographie sur papier	17
Son emploi en biologie.	19
La séparation de l'adrénaline et de l'artérénol par chro- matographie sur papier	20
Partie expérimentale:	
Conditions de travail	23
Application du réactif N.N.C.D.	25
Séparation par le butanol:	
saturé par un acide inorganique	26
saturé par un acide organique	27
acide acétique.	27
acide trichloracétique	28
acide formique	29
Séparation par le phénol.	31
Conclusions	36
Annexes: tabelles numériques.	37
Photo d'un chromatogramme	39
Bibliographie	41

